

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 高田 顕太郎

横浜市立大学大学院医学研究科 医科学専攻

頭頸部生体機能・病態医科学

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 分子病理学 教授 藤井 誠志

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 実験動物医学 准教授 中澤 正年

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学 講師 松本 憲二

博士の学位論文審査結果の要旨

Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method

(オルガノイド培養法を用いた患者由来異種移植片からの唾液腺腺様嚢胞癌細胞株樹立)

学位論文の審査にあたり、審査冒頭で以下のように学位研究の要旨が説明された。申請者は上記表題について発表を行った。

腺様嚢胞癌（ACC）は、頭頸部悪性腫瘍全体の約 1%、唾液腺癌全体の約 10～15%に相当する難治性希少癌である。主な治療法は手術と術後放射線療法であり、それ以外にエビデンスのある根治治療は確立されていない。唾液腺 ACC は特徴的な融合遺伝子として *MYB-NFIB* や *MYBL1-NFIB* が報告されており、PDX モデルを利用して解析した報告がみられる。一方で、癌細胞の培養が難しいことから一般に研究に利用できる細胞株がほとんど存在せず、*in vitro* や *in vivo* の研究は十分にできていない。近年、多くの他癌腫においてヒト由来癌細胞株樹立の成功率と再現性が高い、画期的な培養法としてオルガノイド培養法が注目されている。今回、これまでの PDX モデルとオルガノイド培養を組み合わせることで、高い組織学的・遺伝学的再現性を有する新規の *in vitro*, *in vivo* モデルを開発した。

7 人の唾液腺 ACC 患者からの腫瘍検体を採取。NSG マウスを用いて患者由来異種移植片（PDX）の作成、マトリゲルを用いたヒト腫瘍由来オルガノイドの作成、病理組織学的評価、遺伝子学的解析を施行。作成されたヒト唾液腺 ACC 由来オルガノイドと、PDX 由来唾液腺 ACC オルガノイドを NSG マウスに同所性異種移植し、腫瘍形成の確認とその特性解析（免疫組織化学、RT-PCR、STR）を行い、原発腫瘍と PDX 腫瘍と比較。最後に短期培養された PDX 由来唾液腺 ACC オルガノイドを用いた薬剤感受性試験を施行。

結果として、7 例中 5 例はヒト原発腫瘍由来のオルガノイド培養が複数回可能であった。1 例は NSG マウスの顎下腺に同所性異種移植で腫瘍形成を確認。また、7 例中 4 例で PDX を樹立し、2 例で PDX 由来オルガノイドを樹立。PDX 由来オルガノイドで作成した同所性異種移植片は、原発腫瘍と比べて組織学的・遺伝子学的にも相同性が高く、薬剤感受性試験で、コントロールとして使用した頭頸部扁平上皮癌細胞株（FADU）に比べ PDX 由来 ACC オルガノイドの IC50 が高く、これまでのシスプラチンへの感受性の報告に矛盾しなかった。

この研究で、ACC の原発腫瘍から、高い再現性を持つヒト ACC 由来オルガノイド、および PDX 由来 ACC オルガノイドを作製するという新しい基礎研究モデルを提示した。我々のアプローチは、ACC の基礎研究を推進し、ACC または他の悪性腫瘍の患者のための個別化された治療計画を作成する前臨床モデルとして有用なツールとなり得ると考えられた。

論文の要旨の説明に続いて、以下のような質疑応答がなされた。

中澤副査のコメント及び質疑応答の概要

1. 学位研究報告書の 15 ページに記載のある PDX の実験手順の文書について、動物実験の計画書に基づいて行ったのであれば動物実験委員会で承認（学長承認）されたというように修正をしてください。

申請者応答：修正します。

2. 患者からの PDX (YCU-ACC-11L) より、PDX から作製したオルガノイド(YCU-ACC-1X,4X)を使用して同所性異種移植片を作製した方が、増殖が早いということだったが、もともとそれぞれの腫瘍（11L や 1 や 4）の増殖力の性質の違いによるのではないか。
申請者応答：各患者に 1（～数）匹程度しか PDX を作れていないので数が少なく、もともとの原発腫瘍の増殖力の性質によるものを見ている可能性を否定はできない。

3. ACC11L はマトリゲルを含む同所性異種移植を行い、ACC10 ではマトリゲルを含まない移植を行っているが、結果が違う（生着したものと生着していないもの）のは、マトリゲルを入れた影響ではないのか？また、YCU-ACC-1 や 4 も同所性異種移植をしたのか？

申請者応答：後にわかったんですが、マトリゲルを含んで移植した方が、顎下腺に同所性異種移植した際に、腫瘍細胞は分散しないで生着しやすいことがわかった。YCU-ACC-10 オルガノイドを同所性異種移植して際に、移植細胞が拡がり生着しにくいと考えられました。YCU-ACC-1 や 4 に関しては研究当初であり培養条件の検討のため細胞を浪費してしまったため、移植に足りるほどの細胞が確保できなかった。

松本副査のコメント及び質疑応答の概要

1. 同じ患者検体でプライマリーと PDX 由来オルガノイドで検討できていないが、限られた検体数の中であり、うまく考察はできていると思う。
2. 今回は薬剤感受性試験と同所性異種移植を行っているが、PDX 由来オルガノイドを何か他に利用することを考えていますか？

申請者応答：長期的な継代が可能になれば、遺伝子の発現をみて、発現を落とす等をして、転移であったり抗がん剤の耐性に影響するかであったりを評価することが考えられます。

3. 今後長期継代をするためには、どこがポイントですか？

申請者応答：組織型として増殖力が高いとされる唾液腺導管癌などのほうが、同じ培養法や似た培養法でも長期継代が期待できると考えます。また、ACC は腫瘍内に導管様

の細胞と筋上皮系の細胞の2種類の細胞が混在する組織であるため、筋上皮様細胞に関しては今回と異なる培養方法（CAFの培養で用いられる方法など）で培養して、移植をするときに（導管様腫瘍細胞と）合わせるといった方法にしたほうが長期培養を期待できると考えます。

藤井主査のコメント及び質疑応答の概要

1. モデルをつくる場合の漢字は「作成」ではなく「作製」が適当

申請者応答：修正します。

2. 唾液腺腫瘍の悪性度は組織型によって分類するという考え方と、ki-67などの増殖能のマーカーで評価しようとする考え方がある。確立したACCの中でも融合遺伝子以外のゲノム・エピゲノムの変化を確認して、他の個体と何が違うのか検索して今回の薬剤を選んだのか。あるいは今はまだそこまで検索はしていないのか、今回のような分子標的薬の有効性は、そのような各個体のゲノム・エピゲノムの変化などの背景によって評価が変わってくると思いますが、どう考えていますか。

申請者応答：今回に関しては分子学的な点から有効性が期待できる抗がん剤を選ぶことはできていない。臨床的にあるいは、既報があって有効性が期待できる薬剤を選んだ。検体数が増えたときにそういったゲノム・エピゲノムのような個体の背景についても検討していきたいと考えています。

3. ACCは筋上皮様細胞と導管上皮様細胞の2相性を残した腫瘍である。Indolent tumorであるが、肺転移などしてしまう。筋上皮細胞を観察しているようだが、そこに十さんの有用性を感じる。もともとACCは筋上皮細胞が足場を作っている腫瘍であり、筋上皮細胞をコントロールするような治療法の研究はオリジナリティもあって良いと思われるが、どう思いますか。

申請者応答：今回の研究の初代培養で、平面培養した際に筋上皮細胞か癌関連線維芽細胞（CAF）かわからない（紡錘形の）細胞が培養されることが分かっており、最初にFACS等でそういった細胞を分離・回収し、濃度を高めて培養すれば継代できる可能性があると考えています。また、ACC2などは腫瘍の中心から検体を採取したところ、細胞外マトリックスに囲まれた中に導管様細胞のような腫瘍細胞が見られる構造でした。しかし、腫瘍細胞は壊死するでもなく存在しており、筋上皮様細胞やそれに産生される細胞外マトリックスは腫瘍細胞の増殖に関わっていると考えます。また、筋上皮癌のPDXは作製できているのですが、筋上皮癌の（有用な）細胞株の報告はなく、研究すると面白いと思います。

以上、審査発表、質疑応答は適切になされた。

また、学位研究報告書の内容も質疑応答の結果をふまえ適切に改定されていた。

以上より，本研究は博士（医学）の学位に値するものと判定された.